

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-197770

(43)公開日 平成6年(1994)7月19日

(51)Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 N 15/57

9/50

9359-4B

// (C 1 2 N 15/57

C 1 2 R 1:00)

9050-4B

C 1 2 N 15/ 00

A

審査請求 未請求 請求項の数3(全 8 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号

特願平5-17068

(22)出願日

平成5年(1993)1月7日

(71)出願人 591038141

寶酒造株式会社

京都府京都市伏見区竹中町609番地

(72)発明者 山本 克彦

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造

株式会社中央研究所内

(72)発明者 中島 恭子

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造

株式会社中央研究所内

(72)発明者 小山 信人

滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造

株式会社中央研究所内

(74)代理人 弁理士 中本 宏 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 超耐熱性プロテアーゼ遺伝子

(57)【要約】

【目的】 超耐熱性プロテアーゼ遺伝子を単離し、該遺伝子を用いた超耐熱性プロテアーゼの工業的製法を提供する。

【構成】 図1の制限酵素地図で表される超耐熱性プロテアーゼ遺伝子。これにハイブリダイズ可能な超耐熱性プロテアーゼ遺伝子。これら遺伝子を含有させた組換え体プラスミドを導入させた形質転換体を培養する超耐熱性プロテアーゼの製法。

EcoT22I B_{gl}III EcoRI EcoT22I EcoRI

2.8 kb

定することにより、目的のプロテアーゼ遺伝子を含む組換えプラスミドを得ることができる。すなわち、前記プラスミドpPhe2をStu I（宝酒造）、BamHI（宝酒造）消化して得られる約5 kbのDNA断片は超耐熱性プロテアーゼ遺伝子を含んでおり、これをプラスミドベクターpUC19（宝酒造）のHinc II、BamHIサイトに導入することができる。

【0009】該プラスミドはプラスミドpPheS2と命名され、これを導入した大腸菌JM109を培養して得られる培養物のライゼートは超耐熱性プロテアーゼ活性を示す。図3にプラスミドpPheS2の制限酵素地図を示す。図中、太実線がプラスミドベクターpUC19への挿入DNA断片である。

【0010】更に前記プラスミドpPheS2より超耐熱性プロテアーゼ遺伝子を含まない約1 kbのDNA断片を次のように除くことができる。すなわち、前記プラスミドpPheS2をPst I、Bgl II（宝酒造）消化して得られる約1.4 kbのPst II-Bgl II断片及び約2.6 kbのBgl II-Bgl II断片をPst I、BamHI消化したプラスミドベクターpUC19に導入し、組換えプラスミドを作製する。該プラスミドを導入した大腸菌JM109を培養した後、培養物中の超耐熱性プロテアーゼ活性を測定し、活性を示したコロニーよりプラスミドを調製する。

【0011】該プラスミドはプラスミドpPheS3と命名され、該プラスミドで形質転換された大腸菌JM109はEscherichia coli JM109/pPheS3と命名、表示され、工業技術院微生物工業技術研究所に、微工研菌寄第13349号（FERM P-13349）として寄託されている。

【0012】図4にプラスミドpPheS3の制限酵素地図を示す。図中、太実線がプラスミドベクターpUC19への挿入DNA断片である。

【0013】更に前記プラスミドpPheS3より、超耐熱性プロテアーゼ遺伝子を含まない約1.2 kbのDNA断片を次のように除くことができる。すなわち、最初に前記プラスミドpPheS3をPst I、EcoT22I（宝酒造）消化して得られる3種のDNA断片のうち約0.6 kbのDNA断片のみを取り除いてライゲーションを行い、大腸菌JM109に導入する。得られたコロニーの超耐熱性プロテアーゼ活性を測定し、活性を示したコロニーよりプラスミドを調製する。

【0014】該プラスミドはプラスミドpPheE1と命名され、該プラスミドで形質転換された大腸菌JM109はEscherichia coli JM109/pPheE1と命名されている。図5にプラスミドpPheE1の制限酵素地図を示す。図中太実線がプラスミドベクターpUC19への挿入DNA断片である。

【0015】次に該プラスミドpPheE1をEcoRI（宝酒造）消化して得られる3種のDNA断片のうち約0.6 kbのDNA断片のみを取り除いてライゲーションを行

い、大腸菌に導入する。得られたコロニーの超耐熱性プロテアーゼ活性を測定し、活性を示したコロニーよりプラスミドを調製する。該プラスミドはプラスミドpPheE2と命名され、該プラスミドで形質転換された大腸菌JM109はEscherichia coli JM109/pPheE2と命名されている。図6にプラスミドpPheE2の制限酵素地図を示す。図中、太実線がプラスミドベクターpUC19への挿入DNA断片である。

【0016】図1にプラスミドpPheE2に挿入されたピロコッカス フリオサス由来DNA断片の制限酵素地図を示す。すなわち図1は本発明により得られる超耐熱性プロテアーゼ遺伝子の1例の制限酵素地図を示す図である。

【0017】超耐熱性プロテアーゼ遺伝子を含むさせた組換え体プラスミドを導入させた形質転換体、例えばEscherichia coli JM109/pPheS3、Escherichia coli JM109/pPheE1、Escherichia coli JM109/pPheE2は、それぞれ通常の培養条件、例えば100 µg/mlのアンプシリンを含む2×TY培地（トリプトン16 g/リットル、酵母エキス10 g/リットル、NaCl 5 g/リットル、pH 7.2）中、37℃で培養することにより、培養物中に超耐熱性プロテアーゼを発現させることができる。培養終了後、培養菌体を集菌し、得られた菌体の超音波処理後の遠心上清を粗酵素液とし、該酵素液の100℃、10分間の熱処理による夾雑タンパク質の変性処理、除核膜処理、硫酸塩析処理、透析処理、イオン交換クロマトグラフィー、限外ろ過処理、ゲルろ過処理等を行うことにより、精製酵素製品を得ることができる。

【0018】本発明の超耐熱性プロテアーゼ遺伝子を含むさせた組換え体プラスミドを導入させた形質転換体、例えばEscherichia coli JM109/pPheS3が生産する超耐熱性プロテアーゼの酵素化学的及び理化学的性質は次のとおりである。

【0019】（1）作用

本発明の酵素は、グルタリル-L-フェニルアラニン-p-ニトロアニリドを加水分解し、黄色物質を生成する。更にベンゾイル-L-チロシン-p-ニトロアニリドを加水分解し、黄色物質を生成する。更にまた、酸化型インシュリンB鎖を加水分解し、短鎖ポリペプチドを生成する。

【0020】（2）酵素活性測定方法

酵素活性の測定は、酵素のグルタリル-L-フェニルアラニン-p-ニトロアニリドを加水分解活性を、加水分解で生成するp-ニトロアニリンを分光学的に追跡することにより測定した。すなわち酵素活性を測定しようとする酵素製品を適度に希釈し、その試料溶液10 µlに5 mMグルタリル-L-フェニルアラニン-p-ニトロアニリド溶液（50 mMリン酸カリウム、pH 6.5）40 µlを加え95℃で30分間反応させた。水冷して反応を停止した後、410 nmにおける吸光度を測定しp-ニ

10

20

30

40

50

0.003%, NaClの0.001%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0001%, CoSO_4 0.0001%, $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0001%, ZnSO_4 0.0001%, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.1ppm, $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ 0.1ppm, H_3BO_3 0.1ppm, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1ppm, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.25ppmの組成の培地2リットルを2リットル容のメディウムボトルに入れ、120℃、20分間殺菌した後、窒素ガスを吹込み溶存酸素を除去した後、これに上記菌株を接種して95℃、16時間静置培養した。培養後、遠心分離によって菌体を集めた。次に菌体を25%スクロースを含む0.05M トリス-HCl (pH 8.0) 4mlに懸濁し、この懸濁液に0.8mlのリゾチーム [5mg/ml, 0.25M トリス-HCl (pH 8.0)]、2mlの0.2M EDTAを加えて、20℃で1時間保温した後、24mlのSET溶液 [150mM NaCl, 1mM EDTA, 2.0mM トリス-HCl (pH 8.0)]を加え、更に5% SDS、4mlプロテイナーゼK (10mg/ml) 400μlを加え、37℃、1時間反応させた。反応終了後、フェノールクロロホルム抽出、続いてエタノール沈殿を行い、約3.2mgのゲノムDNAを調製した。

【0032】(コスミドプロテインライブラリーの作製)ピロコッカス フリオサス ゲノムDNA 400μgをSau3AIで部分消化し、密度勾配超遠心法により、35~50kbにサイズ分画した。次に、トリプルヘリックスコスミドベクター1μgをBamHI消化し、上記分画された35~50kbのDNA 140μgと混合してライゲーションを行い、ガイガーバック ゴールド (ストラテジーン)を用いたインピットロパッケージング法によってピロコッカス フリオサス ゲノムDNAのフラグメントをラムダファージ粒子中にパッケージングした。得られたファージ溶液の一部を用いて大腸菌 DH5α MCRを形質転換し、ライブラリーを調製した。得られたコロニーのうち数個を選んでコスミドを調製し、適当な大きさの挿入断片があることを確認したのち、調製した500個のコロニーから個別に形質転換体を100μg/mlのアンプシリンを含む150mlのLB培地 (トリプトン 10g/リットル、酵母エキス5g/リットル、NaClの5g/リットル、pH 7.2) 中で培養した。該培養物を遠心し、回収した菌体を20mM トリス-HCl、pH 8.0 1mlに懸濁し、100℃で10分間熱処理した。続いて超音波処理を行い、更にもう一度100℃、10分間熱処理した。遠心後の上清として得られるライゼートをコスミドプロテインライブラリーとした。

【0033】(超耐熱性プロテアーゼ遺伝子を含むコスミドの選抜)プロテアーゼ活性は、グルタリル-L-フェニルアラニン-p-ニトロアニリド加水分解活性を、加水分解で生成するp-ニトロアニリンを分光学的に追跡することにより測定した。すなわち、上記コスミドプ

ロテインライブラリーからライゼート20mlずつを取り、1mMのグルタリル-L-フェニルアラニン-p-ニトロアニリド溶液 (50mM トリス-HCl, pH 7.5) 150μlを加え、95℃で60分間反応させた。氷冷して反応を停止した後、410nmにおける吸光度を測定し、p-ニトロアニリンの生成量を求めた。コスミドプロテインライブラリーよりプロテアーゼ活性を持つ4個のコスミドクローンを得た。

【0034】(超耐熱性プロテアーゼ遺伝子を含むプラスミドpPhe2の調製)プロテアーゼ活性を持つ4個のコスミドクローンより1個を選びコスミドを調製し、Pst I消化した後、pUC118のPst Iサイトにライゲーションした。この組換えプラスミドを大腸菌JM109に導入した後、アンプシリン (100μg/ml)を含むLBプレート上にまき、出現したコロニーについて100μg/mlのアンプシリンを含む5mlのLB培地中で培養を行った。該培養物を遠心し回収した菌体を50mM トリス-HCl, pH 7.5の100μlに懸濁し、100℃、10分間熱処理を行った後、超音波処理により菌体を破砕した。更にもう一度100℃、10分間熱処理を行い、遠心してライゼートを得た。このライゼートについてプロテアーゼ活性を測定した。すなわち10μlのライゼートに5mMグルタリル-L-フェニルアラニン-p-ニトロアニリド溶液 (50mM トリス-HCl, pH 7.5) 40μlを加え、95℃で30分間反応させた。氷冷して反応を停止した後、410nmにおける吸光度を測定し、p-ニトロアニリンの生成量を求めた。プロテアーゼ活性を有するコロニーよりプラスミドを調製し、これをプラスミドpPhe2と命名した。

【0035】(超耐熱性プロテアーゼ遺伝子を含むプラスミドpPheS2の調製)上記プラスミドpPhe2について制限酵素を用いて図2に示す、制限酵素地図を作製した。この制限酵素地図を基にpPhe2由来の粗々のDNA断片をプラスミドpUC19にライゲーションして大腸菌JM109に導入し、前述の方法によりコロニーのプロテアーゼ活性を調べた。Stu I、BamHI消化によって得られる約5kbのDNA断片をpUC19のHinc II、BamHIサイトに挿入した組換えプラスミドを導入したコロニーに超耐熱性プロテアーゼ活性が見られた。このコロニーよりプラスミドを調製し、これをプラスミドpPheS2と命名した。図3にプラスミドpPheS2の制限酵素地図を示す。

【0036】(超耐熱性プロテアーゼ遺伝子を含むプラスミドpPheS3の調製)上記プラスミドpPheS2をPst I、Bgl II、で同時に消化した後、アガロースゲル電気泳動を行い、約1.4kbのPst I-Bgl II断片、及び約2.6kbのBgl II-Bgl II断片をアガロースゲルより回収した。この2つのDNA断片とBamHI、Pst I消化したpUC19との間でライゲーションを行って大腸菌JM109に導入し、前述の方法によりコロニーのプロテアーゼ活

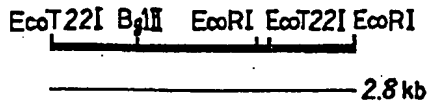
【図7】超耐熱性プロテアーゼの至適温度を示す図である。

【図8】超耐熱性プロテアーゼの至適pHを示す図である。

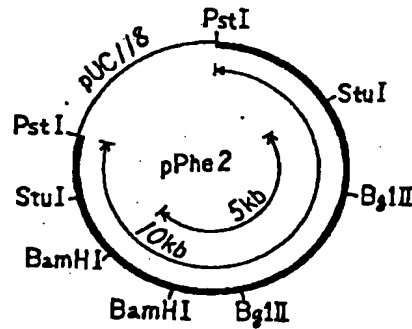
【図9】超耐熱性プロテアーゼの熱安定性を示す図である。

【図10】超耐熱性プロテアーゼのpH安定性を示す図である。

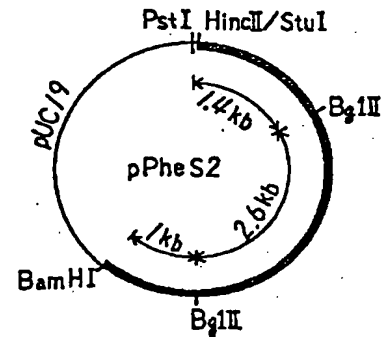
【図1】



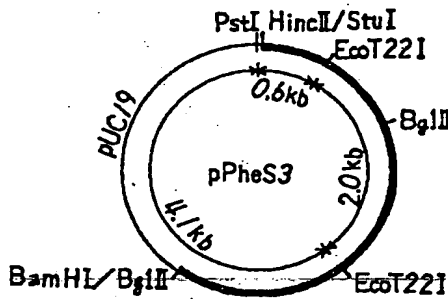
【図2】



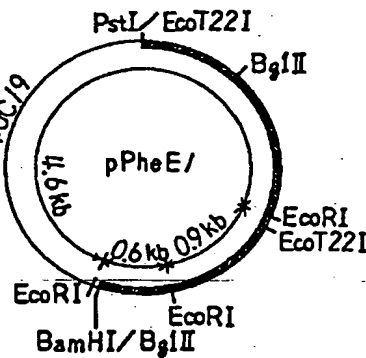
【図3】



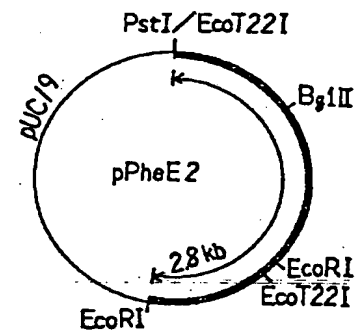
【図4】



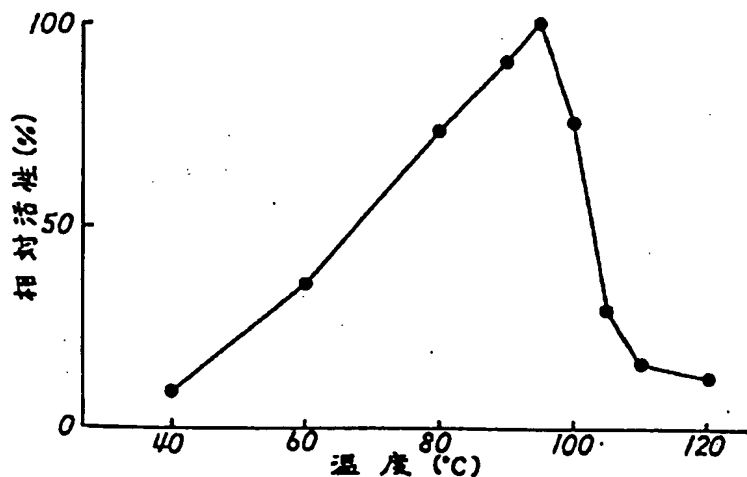
【図5】



【図6】



【図7】



【図8】

